

Report a data error here

```

Met Val Cys Arg Leu Pro Val Ser Lys Lys Thr Leu Leu Cys Ser Phe
  1           6           10           15
Gln Val Leu Asp Glu Leu Gly Arg His Val Leu Leu Arg Lys Asp Cys
      20           25           30
Gly Pro Val Asp Thr Lys Val Pro Gly Ala Gly Glu Pro Lys Ser Ala
    35           40           45
      |
      |
      |
      |
      |
      |
Pro Phe Trp Ala Ile Lys Asn Ser Trp Gly Thr Asp Trp Gly Gln Lys
  355           360           365
Gly Tyr Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys Gly Val Asn Thr
  370           375           380
Met Ala Ser Ser Ala Val Val Asp
  385           390

```

05/05/30

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-99084

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月21日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

A 6 1 K 38/46

A 6 1 K 48/00

A A H

48/00

A A H

A A M

A A M

A B G

A B G

A B J

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-106510

(22) 出願日 平成9年(1997) 4月24日

(31) 優先権主張番号 特願平8-104901

(32) 優先日 平8(1996) 4月25日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 吉村 浩二

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ101号

(72) 発明者 引地 裕一

茨城県つくば市松代四丁目21番2 シャレ

ールつくば松代1号棟504

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質およびそのDNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】新規システインプロテアーゼの提供。

【解決手段】新規システインプロテアーゼもしくはその部分ペプチド、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含有する組換えベクター、形質転換体、該タンパク質の製造法、該タンパク質もしくはDNA含有してなる医薬、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質のプロテアーゼ活性を促進もしくは阻害する化合物のスクリーニング方法、スクリーニング用キットおよびスクリーニングで得られる化合物またはその塩。

【効果】タンパク質またはそれをコードするDNAは、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩。

【請求項2】システインプロテアーゼ活性を有する請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項4】請求項1記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項5】配列番号：3で表わされる塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

【請求項6】請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項7】請求項6記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】請求項7記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその塩の製造方法。

【請求項9】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬。

【請求項10】糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝繊維症、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である請求項9記載の医薬。

【請求項11】請求項4記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項12】糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝繊維症、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である請求項11記載の医薬。

【請求項13】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項14】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法。

【請求項15】請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット。

【請求項16】請求項14記載のスクリーニング方法または請求項15記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のタンパク質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なシステインプロテアーゼおよびそのDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】リソゾームは多数の加水分解酵素を含む細胞内小器官であり、リソゾームのプロテアーゼ群は協同的に働くことにより、細胞内・外より取り込まれたタンパク質を分解する。これには、リソゾーム内のパバインファミリーに属するシステインプロテアーゼ群が主役を演じていることが分かっている。また、これらの酵素の一部は細胞外に活性を有しない前駆体の形で分泌され、活性化を受けた後にタンパク質の分解に関与する。パバインファミリーに属するシステインプロテアーゼは哺乳動物、植物、寄生虫、原虫、昆虫ウイルス等に広く分布しており、マンソン住血吸虫のカテプシンL様システインプロテアーゼはヘモグロビンの分解に関与することが示唆されている(A. M. Smithら、モレキュラー・アンド・バイオケミカルパラサイトロジー、67巻、11-19頁、1994年)。ヒトでは、パバインファミリーに属するシステインプロテアーゼはカテプシンB、H、LおよびSのアイソザイムが古くから知られている。これらの酵素は、活性に関与するシステイン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸およびこれらのアミノ酸の周辺のcatalytic domainのアミノ酸配列は非常によく保存されているが、異なった酵素特性を示すことが知られている。例えば、カテプシンHやBはエンドペプチダーゼ活性は弱く、アミノペプチダーゼまたはカルボキシルペプチダーゼ活性が顕著である。一方、カテプシンLおよびSは強いエンドペプチダーゼ活性を示す。最近、破骨細胞に発現が顕著なカテプシンO(OC2)が報告され、新規のアイソザイムが存在する可能性が示唆されている。

【0003】カテプシンB、H、L(S. Galら、バイオケミカルジャーナル、253巻、303-306頁、1988年)およびSのシステインプロテアーゼはプロ酵素の活性化、酵素の不活化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収および組織の再構成等様々な生理活性を有することが知られている。特に、組織の再構成におけるシステインプロテアーゼの持つ蛋白分解活性は非常に重要である。これらの酵素自身がコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスの分解酵素として働くだけでなく、他の細胞外マトリックス分解酵素であるセリンプロテアーゼ群やマトリックス金属プロテアーゼ群の活性化を引き起こすことが知られている。また、システインプロテアーゼは、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病等の神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患等の種々の疾病との関連が明らかにされている。従って、これらの酵素の活性を調節する、阻害剤または促進剤は上記の疾病の治療薬として用いられ得る。一方、欧米では、パバインファミリーに属するキモパバインが椎

間板ヘルニアの治療に古くから用いられている。しかし、アナフィラキシーを引き起こすことがあり、適応できる患者は限定され、ヒト由来の抗原性のないプロテアーゼが望まれている。

【0004】cDNAライブラリーからランダムに選んだcDNAクローンの部分配列(expressed sequence tags、ESTsと略される)を決定することにより、その臓器や細胞における遺伝子発現のレベルや新規遺伝子を見いだす試みが報告されている。M. D. Adamsらは脳のcDNAライブラリーから得たESTsを多数報告している(ネイチャージェネティクス、4巻、373-380頁、1993年)。これらのESTsの一つであるEST06771(GenBankアクセッション番号T08879)は、ESTのデータベースであるdbESTにおいて、大豆等の植物やトリパノゾーマ等のシステインプロテアーゼと類似していることが記載されている。しかし、ESTsの配列は正確性に欠け、かつ一部分の塩基配列であることから、データベースに登録されているESTsの塩基配列と同一の遺伝子が実際に存在し、かつ生体内で機能しているかどうかは明らかではなかった。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】新たなヒト由来のシステインプロテアーゼは、システインプロテアーゼに対して阻害活性あるいは促進活性を発揮し、システインプロテアーゼに基づく種々の疾患、例えば、関節炎、神経変成疾患、筋消耗性疾患等の予防や治療に役立つ新たな医薬品の開発を可能にする。したがって、本発明の分野では、ヒト由来の新規システインプロテアーゼを見いだし、大量に産生する方法の開発が望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト脾臓由来cDNAライブラリーから、新規な塩基配列を有するcDNAをクローニングすることに成功し、それにコードされるタンパク質がシステインプロテアーゼであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、(1)配列番号：1で表わされるアミノ酸配列またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩、(2)システインプロテアーゼ活性を有する第(1)項記載のタンパク質、(3)第(1)項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、(4)第(1)項記載のタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(5)配列番号：3で表される塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、(6)第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、(7)第(6)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(8)第(7)項記載の形質転換体を培養し、第(1)項記載のタンバ

ク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第(1)項記載のタンパク質またはその塩の製造方法、(9)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる医薬、(10)糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝繊維症、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である第(9)項記載の医薬、

【0008】(11)第(4)項記載のDNAを含有してなる医薬、(12)糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝繊維症、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である第(11)項記載の医薬、(13)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、(14)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、(15)第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有してなる第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット、および(16)第(14)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩を提供する。

【0009】さらに、本発明は、(17)配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する第(3)項記載の部分ペプチド、(18)配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(19)第(18)項記載のDNAを含有する組換えベクター、(20)第(19)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、(21)第(20)項記載の形質転換体を培養し、タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするタンパク質またはその塩の製造方法、(22)第(21)項記載の製造法で製造されるタンパク質またはその塩、(23)第(14)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(24)糖尿病性腎症、子球体腎炎、肝繊維症、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛または大理石病の治療・予防剤である第(23)項記載の医薬、(25)第(14)項記載のスクリーニング方法または第(15)項記載のスクリーニ

ング用キットを用いて得られる、第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、(26)慢性関節リウマチ、変形性関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病、筋ジストロフィー症、角膜疾患、水疱瘡、歯周病、天疱瘡、早産または分娩遅延の治療・予防剤である第(25)項記載の医薬、(27)第(13)項記載の抗体と、被検液および標識化された第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法、および(28)被検液と担体上に不溶化した第(13)項記載の抗体および標識化された第(13)項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の第(1)項記載のタンパク質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量法を提供する。

【0010】本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞

（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列などが挙げられ、特に、タンパク質の構成アミノ酸配列として少なくとも配列番号：2

で表わされるアミノ酸配列を含有し、全体として配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアミノ酸配列などが好ましい。

【0011】本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、プロテアーゼ活性（例、プロテイナーゼ活性、ペプチダーゼ活性など）などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理的に）同質であることを示す。したがって、プロテアーゼ活性などの活性が同等（例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~10倍、より好ましくは約0.5~2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。プロテアーゼ活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0012】また、本発明のタンパク質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個（例、1~5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個（例、1~5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個（例、1~5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。上記のようにアミノ酸配列が欠失、付加または置換されている場合、その欠失、付加または置換の位置としては、特に限定されないが、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列のうち、第179番目のAla~第392番目のAspまでのアミノ酸配列（すなわち、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列）以外の位置などが挙げられる。

【0013】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド表記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-CO

O-)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)または
 エステル(-COOR)であってもよい。ここでエステ
 ルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-
 プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC
 1-6 アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキ
 シルなどのC₃₋₈ シクロアルキル基、例えば、フェニ
 ル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂ アリール基、例えば、ベン
 ジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂ アルキル基
 もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C
 1-2 アルキル基などのC₇₋₁₄ アラルキル基のほか、経口
 用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基
 などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外に
 カルボキシル基(またはカルボキシレート)を有してい
 る場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化さ
 れているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場
 合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステ
 ルと同様のエステルなどが用いられる。さらに、本発明
 のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末
 端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホル
 ミル基、アセチル基などのC₁₋₆ アシル基など)で保護
 されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグル
 タミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミ
 ノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-COOH、
 -SO₃Hなど)が適当な保護基(例えば、ホルミル
 基、アセチル基などのC₁₋₆ アシル基など)で保護され
 ているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパ
 ク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタ
 ンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表
 わされるアミノ酸配列を含有するヒト脾臓由来のシステ
 インプロテアーゼなどが用いられる〔図1〕。

【0014】本発明の部分ペプチドとしては、前記した
 本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましく
 は、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性(例、プ
 ロテアーゼ活性など)を有するものであればいずれのも
 のでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ
 酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個
 以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは1
 00個以上、もっとも好ましくは200個以上のアミノ
 酸配列を有するペプチドなどが用いられる。本発明の部
 分ペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：2で
 表わされるアミノ酸配列を有するペプチドの他、配列番
 号：2で表わされるアミノ酸配列〔図2〕と実質的に同
 一のアミノ酸配列を有し、配列番号：2で表わされるア
 ミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有
 するペプチドなどが用いられる。配列番号：2で表わさ
 れるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、
 配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と約60%以
 上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80
 %、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約9
 5%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここ

で、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列は、配列番
 号：1で表わされるアミノ酸配列の第179番目のAla
 ~第392番目のAspまでのアミノ酸配列を示す。
 このアミノ酸配列は、本発明のタンパク質の活性中心部
 位のアミノ酸配列であり、本発明の配列番号：1で表わ
 されるアミノ酸配列を有するタンパク質の成熟体(活性
 体)のアミノ酸配列である。すなわち、本発明のタンパ
 ク質は、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配
 列を有するタンパク質として発現されるが、生体内にお
 いて、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列の第1番
 目~178番目のアミノ酸配列部分が切断され、配列番
 号：1で表わされるアミノ酸配列の第179番目~39
 2番目のアミノ酸配列(すなわち、配列番号：2で表わ
 されるアミノ酸配列)を有するペプチドが成熟体(活性
 体)としてプロテアーゼ活性等を発揮する。「実質的に
 同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同
 質の活性」の測定は後述するスクリーニング方法に従っ
 て測定することができる。

【0015】また、本発明の部分ペプチドには、例え
 ば、①配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1ま
 たは2個以上(好ましくは、1~20個程度、より好ま
 しくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(例、1
 ~5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列
 番号：2で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上
 (好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~1
 0個程度、さらに好ましくは数個(例、1~5個))の
 アミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：2で表
 わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましく
 は、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、
 さらに好ましくは数個(例、1~5個))のアミノ酸が
 他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それ
 らを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなど
 も用いられる。また、本発明の部分ペプチドはC末端が
 通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレ
 ート(-COO-)であるが、前記した本発明のタンパク
 質のごとく、C末端がアミド(-CONH₂)またはエ
 ステル(-COOR)であってもよい。さらに、本発明
 の部分ペプチドには、前記の本発明のタンパク質と同様
 に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護
 されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグル
 タミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミ
 ノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されている
 もの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなど
 の複合ペプチドなども含まれる。本発明の部分ペプチド
 は抗体作成のための抗原として用いることもできるの
 で、必ずしもプロテアーゼ活性を有する必要はない。

【0016】本発明のタンパク質またはその部分ペプチ
 ドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加
 塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸(例
 えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、ある

いは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のタンパク質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてすることにより精製分離することができる。

【0017】本発明のタンパク質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-

(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0018】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用することが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド

類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0019】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブチルオキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0020】原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0021】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシ基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様に、所望のタンパク質のエステル体を得ること

ができる。

【0022】本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他, ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平, 生化学実験講座 1, タンパク質の化学IV, 205, (1977年)

⑤矢島治明監修, 続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0023】本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性（例、プロ

テアーゼ活性などの活性)を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでよい。

【0024】配列番号：3で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：3で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号：1のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNA〔図3の第56番目~1231番目の塩基配列〕などが用いられる。

【0025】本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、②配列番号：3で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性(例、プロテアーゼ活性などの活性)を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。より具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNA、または配列番号：4で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と同質の活性を有する部分ペプチドをコードするDNAなどが用いられる。配列番号：4で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90

%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。より具体的には、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を有する本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列〔図3の第590番目~1231番目の塩基配列〕を有するDNAを含有するDNAなどが用いられる。

【0026】本発明のタンパク質またはその部分ペプチド(以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、(1)本発明のタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、PCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または(2)適当なベクターに組み込んだDNAと、本発明のタンパク質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別すること、などが挙げられる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換(欠失・置換・付加)は、公知のキット、例えば、MutanTM-G(宝酒造(株))、MutanTM-K(宝酒造(株))などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化された本発明のタンパク質をコードするDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0027】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病

原ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドロンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0028】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子

（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子で形質転換された細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0029】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、

エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクレック・アシーズ・リサーチ,（*Nucleic Acids Research*）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（*Journal of Molecular Biology*）, 120巻, 517（1978）〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459（1969）〕, C600〔ジェネティクス（*Genetics*）, 39巻, 440（1954）〕などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）MI114〔ジーン, 24巻, 255（1983）〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（*Journal of Biochemistry*）, 95巻, 87（1984）〕などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）NCYC1913, NCY2036, ピキア パストリス（*Pichia pastoris*）などが用いられる。

【0030】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（*Spodoptera frugiperda cell*; Sf細胞）、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞（*Bombyx mori* N cell; BmN細胞）などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞（ATCC CRL1711）、Sf21細胞（以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ（*in Vitro*）, 13, 213-217,（1977））などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー（*Nature*）, 315巻, 592（1985）〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO細胞と略記する）、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO（dhfr⁻）細胞と略記する）、マウスL細胞、マウスAtT-20, マウスミエロマ細胞、ラットGH3, ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2細胞などが用いられる。これらの中でも、CHO細胞、CHO（dhfr⁻）細胞、293細胞などが好ましい。

【0031】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 69巻, 21

10(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。パチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)に記載の方法に従って行なうことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)などに記載の方法に従って行なうことができる。発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) 52, 456-467 (1973)], 電気穿孔法 [Nuemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 1, 841-845 (1982)] 等が挙げられる。このようにして、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0032】なお、動物細胞を用いて、本発明のタンパク質を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のタンパク質の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、本発明のタンパク質をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。上記の形質転換体を本発明のタンパク質をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のタンパク質を生成、蓄積せしめることによって、本発明のタンパク質またはその塩を製造することができる。

【0033】宿主がエシェリヒア属菌、パチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチ

ープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出液、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がパチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0034】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動物化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of

the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1(1950)) などが用いられる。pHは約6~8 であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約 15~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。特に、CHO(dhfr-)細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むCMEM培地を用いるのが好ましい。以上のようにして、形質転換体による本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0035】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。本発明のタンパク質を培養菌体、昆虫あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体、昆虫あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体、昆虫あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体、昆虫あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質に、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0036】本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のタンパク質、

その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩(以下、本発明のタンパク質と略記する)に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256、495(1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0037】骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する

方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、10~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0038】（b）モノクローナル抗体の精製
モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0039】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテン（抗原）との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0040】本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）に実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）に相補的な塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0041】本発明のタンパク質は、タンパク質部分の分子量が約3~6万、好ましくは約4~5万であり、活性中心部位の分子量が約2~3万のシステインプロテアーゼ（好ましくは、ヒト型システインプロテアーゼ）であり、プロ酵素の活性化、酵素の不活化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再構成などの生理活性を示す。以下に、本発明のタンパク質またはその塩、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のタンパク質等を略記する場合がある）、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAの用途を説明する。

【0042】（1）本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤
システインプロテアーゼは、プロ酵素の活性化、酵素の不活化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再

構成などの生理活性を発揮するため、システインプロテアーゼをコードするDNAに異常があったり、欠損している場合、あるいはシステインプロテアーゼの発現量が減少している場合、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などのシステインプロテアーゼの異常発現に関与する種々の疾病が発症する。したがって、本発明のタンパク質等およびDNAは、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などのシステインプロテアーゼの異常発現に関与する種々の疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内においてシステインプロテアーゼが減少あるいは欠損しているために、細胞におけるプロテアーゼ活性などが十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAを該患者に投与し、生体内で該タンパク質を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のタンパク質をコードするDNAを挿入し、該タンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質等を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

【0043】本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例え

ば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0044】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液などの医薬組成物は、通常、適当なアンプルに充填される。本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、大理石病治療の目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に該タンパク質等を成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、本発明のタンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、椎間板ヘルニア治療の目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で通常成人(体重60kgとして)に投与する場合は、一日につき該タンパク質等を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度をヘルニア部分に注射することにより投与するのが好都

合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0045】(2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質等は、プロテアーゼの活性化、酵素の不活化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再構成などの生理活性を発揮するので、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、水疱瘡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。一方、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの細胞外マトリックスの蓄積を伴う疾病などの各種疾病の治療・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

【0046】すなわち、本発明は、

(1) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはこれらの塩を用いることを特徴とする本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性を促進する化合物もしくはその塩(以下、促進剤と略記する場合がある)または本発明のタンパク質のプロテアーゼ活性を阻害する化合物(以下、阻害剤と略記する場合がある)のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(2) (i) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはこれらの塩に基質を接触させた場合と(ii) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはこれらの塩に基質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と(ii) の場合における、該タンパク質、その部分ペプチドもしくはこれらの塩のプロテアーゼ活性(あるいは、ペプチダーゼ活性など)を測定して、比較することを特徴とするものである。

【0047】基質としては、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはこれらの塩の基質となり得るものであれば何れのものでもよい。例えば、カゼイン、アソカゼイン、アソアルブミン、アソコラーゲン、FITC化したカゼイン、FITC化したコラーゲン、放射線標識

(例、 ^{14}C 、 ^3H など)したカゼイン、放射線標識

(例、 ^{14}C 、 ^3H など)したコラーゲン、C末側に4-メチルルクマリナー7-アミドやp-ニトロアニリド等を結合させたオリゴペプチド類などが用いられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある)を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、pH約4~10(望ましくは、pH約5~7)の酢酸ナトリウムバッファー、リン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と基質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性(あるいは、ペプチダーゼ活性)は、公知のアソカゼイン法[A. J. Barrettら、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)、80巻、535頁、1981年]に従って測定することができる。例えば、上記

(ii) の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、さらに好ましくは約50%以上上昇させる試験化合物を本発明のタンパク質等の活性を促進する化合物として、一方、上記(ii)の場合におけるプロテアーゼ活性等が上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは約30%以上、さらに好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物として選択することができる。

【0048】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

①測定用緩衝液

pH5.5の酢酸ナトリウムバッファー

②タンパク質標品

本発明のタンパク質または本発明の部分ペプチド

③基質

アソカゼイン 10mg/ml

④反応停止液

10%トリクロロ酢酸

〔測定法〕本発明のタンパク質等に測定用緩衝液、基質を加え、混合後37℃、1時間反応させた後に、反応停止液を加え、4℃で5分間静置後、遠心した上清の366nmの吸光度を計測することによってプロテアーゼ活性を測定する。

【0049】本発明のスクリーニング方法またはスクリ

ーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性、ペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質等の塩と同様のものが用いられる。本発明のタンパク質等の活性を阻害する化合物は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。一方、本発明のタンパク質等の活性を促進する化合物は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの細胞外マトリックスの蓄積を伴う疾病などの各種疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

【0050】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、前述した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などの製剤とすることができる。得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性関節リウマチ治療の目的で本発明のタンパク質等の機能を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0051】（3）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN末端を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC末端に反応する抗体であることが望ましい。

【0052】また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による本発明のタンパク質等の検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0053】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用

いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0054】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0055】これら個々の免疫学的測定法を本発明の定

量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Method 1 s))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。

【0056】さらには、本発明のタンパク質抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質が関与する疾病の診断を行なうことができる。本発明のタンパク質等の濃度の減少が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの疾病である可能性が高いと診断できる。一方、本発明のタンパク質等の濃度の増加が検出された場合は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの疾病の可能性が高いと診断することができる。このように、本発明の抗体は、上記疾病の診断剤として有用である。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0057】（4）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用するこ

とにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）、第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）、第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより該mRNAの発現低下が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの各種疾病等である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、該mRNAの発現過多が検出された場合は、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病等である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾患、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病等である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0058】（5）アンチセンスDNA

前記のとおり、本発明のタンパク質等は、プロ酵素の活性化、酵素の不活化、抗原提示、ホルモン成熟化、骨吸収、組織の再構成などの生理活性を発揮し、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、角膜疾

患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病に關与している。したがって、本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のタンパク質等またはDNAの機能を抑制することができるので、例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節炎などの関節炎、骨粗鬆症、腫瘍転移・浸潤、肺気腫、アルツハイマー病などの神経変成疾患、筋ジストロフィー症などの筋消耗性疾患、角膜疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、水疱泡症などの皮膚疾患、歯周病、天疱瘡、早産、分娩遅延などの各種疾病の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。上記アンチセンスDNAを上記の医薬として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして実施することができる。

【0059】（6）本発明のタンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い動物由来のプロモーターであって、本発明のDNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターも使用することができる。

【0060】受精卵細胞段階におけるDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有する。本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、こ

の雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明のDNAが転移された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用の動物などとして有用である。本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質等が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。

【0061】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ核酸
mRNA : メッセンジャーリボ核酸
dATP : デオキシアデノシン三リン酸

Tos : p-トルエンスルフォニル
CHO : ホルミル
Bzl : ベンジル
Cl₂Bzl : 2, 6-ジクロロベンジル
Bom : ベンジルオキシメチル
Z : ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc : t-ブトキシカルボニル
DNP : ジニトロフェニル
Trt : トリチル
Bom : t-ブトキシメチル
Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

dTTP : デオキシチミジン三リン酸
dGTP : デオキシグアノシン三リン酸
dCTP : デオキシシチジン三リン酸
ATP : アデノシン三リン酸
EDTA : エチレンジアミン四酢酸
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

【0062】

Gly : グリシン
Ala : アラニン
Val : バリン
Leu : ロイシン
Ile : イソロイシン
Ser : セリン
Thr : スレオニン
Cys : システイン
Met : メチオニン
Glu : グルタミン酸
Asp : アスパラギン酸
Lys : リジン
Arg : アルギニン
His : ヒスチジン
Phe : フェニルアラニン
Tyr : チロシン
Trp : トリプトファン
Pro : プロリン
Asn : アスパラギン
Gln : グルタミン
pGlu : ピログルタミン酸
Me : メチル基
Et : エチル基
Bu : ブチル基
Ph : フェニル基
TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキ

サミド基

【0063】また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

HOObt : 3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-
1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0064】本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号：1】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼのアミノ酸配列を示す。

【配列番号：2】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの部分ペプチドのアミノ酸配列を示す。

【配列番号：3】配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：4】配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

【配列番号：5】本発明のタンパク質をコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

【配列番号：6】本発明のタンパク質をコードするDNAのクローニングに使用した合成プライマーの塩基配列を示す。

【0065】後述の実施例1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH10B/pTB1920は、平成8年4月22日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-5515として、平成8年4月19日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO15949として寄託されている。

【0066】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

【0067】

【実施例1】ヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニング

cDNAのクローニングは、ジエントラッパージティブ選択システム (ギブコビーアールエル社) を用いて行った。ヒト脾臓由来のcDNAライブラリー (ギブコビーアールエル社) の大腸菌DH12S株をTerrific Broth (12 g/l bacto-tryptone (ディフコ社), 24 g/l bacto-yeast extract (ディフコ社), 2.3 g/l リン酸-カリウム, 12.5 g/l リン酸二カリウム) で30℃で16時間培養し、キアジェンプラスミドキット (キアジェン社) を用いて、プラスミドcDNAライブラリーを精製抽出した。精製したプラスミドcDNAライブラリーをGeneII, ExoIII (いずれもギブコビーアールエル社) によって消化し、一本鎖cD

NAライブラリーを作成した。一方、プローブとして、合成オリゴヌクレオチド (配列番号：5) をcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた。プローブは、TdT, ビオチン-14-dCTP (ギブコビーアールエル社) を用いて、3'末端をビオチン化することで標識した。一本鎖cDNAライブラリーを95℃で1分間処理した後、氷中で急冷し、ビオチン化したプローブを加えて37℃で1時間、室温でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、ジエントラッパージティブ選択システム・マグネットビーズ (ギブコビーアールエル社) を加えて、室温で2分ごとに攪拌しながら30分間放置した。その後、ジエントラッパージティブ選択システム・マグネットラック (ギブコビーアールエル社) 中に入れ、2分間放置した。上清を捨て、マグネットビーズをジエントラッパージティブ選択システム・ウオッシュバッファーで洗浄した。このウオッシュバッファーによる洗浄を3回行った。その後、マグネットラックに入れて放置し、上清を捨て、ジエントラッパージティブ選択システム・溶出バッファーを加え、5分間室温で放置した。マグネットラックに入れて5分間放置した後、その上清のDNA溶液を回収した。

【0068】取得したDNA溶液にプライマーとして合成オリゴヌクレオチド (配列番号：5) を入れ、95℃で1分間放置した。ジエントラッパージティブ選択システム・修復酵素を加え、70℃で15分間放置して二本鎖DNAを合成した。合成した二本鎖DNAをエレクトロポレーション装置 (バイオ・ラッド社) により、大腸菌DH10B株に導入した。得られた形質転換株を用いて2本のオリゴヌクレオチド (配列番号：5、配列番号：6) をプライマーとしてコロニーPCRによるスクリーニングを行った。PCRにより108bpの増幅断片が形成されたコロニーを陽性クローンとして2株選択した。選択した大腸菌を培養後、DNAを抽出し、Taqダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット (パーキンエルマー社) を用いて反応を行い、377 DNAシーケンサー (パーキンエルマー社) により、cDNA断片の塩基配列を決定した。取得したクローンは、poly(A)・鎖および配列番号：3で表わされる1176個の塩基配列を含有する1740個の塩基配列を有していた。このcDNA断片には、配列番号：1で表される392個のアミノ酸からなる新規システインプロテアーゼがコードされており、活性中心であるシステイン、ヒスチジン、アスパラギン残基も保存されていた。また、ヒト由来カテプシンLとのアミノ酸レベルでの相同性は40%、マンソン住血吸虫由来システインプロテアーゼとのアミノ酸レベルでの相同性は49%しか

なかった。本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードするDNAを保持するプラスミドpTB1920を大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10Bに導入して、形質転換体：大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pTB1920を得た。

【0069】

【実施例2】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの一過性発現と細胞抽出液の調製

実施例1で得たpTB1920はすでに発現プラスミドpCMV・SPORT (ギブコビーアールエル社) に組み込まれており、動物細胞における発現に用いられる。COS-7細胞 (財団法人発酵研究所より購入) を血清含有DMEM培地で培養し、遺伝子導入の前日に継代し50%コンフルエントとなったCOS-7細胞を血清不含DMEM培地で洗浄後、2.5mlの無血清培地を添加し、そこに5μgのpTB1920を含むTRANSFECTAM (ニッポンジーン社) 混合液を加えた。37℃、5%CO₂の条件で4時間培養した後、20%牛血清含有DMEM培地を加え、さらに20時間培養した。血清不含DMEM培地に交換し、3日後に細胞を回収した。細胞はGuo-Ping Shiらの方法 (ジャーナル・バイオリジカル・ケミストリー、267巻、7258-7262頁、1992年) に従って、lysisbuffer (40mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA、1% Triton X-100、pH5.5) に懸濁し、37℃で1時間静置後、遠心 (1,500rpm, 10分) し、新規システインプロテアーゼを含む細胞抽出液を得た。また、TRANSFECTAM溶液のみを加え同様の処理を行なった細胞抽出液をコントロールとして用いた。

【0070】

【実施例3】ヒト脾臓由来システインプロテアーゼによるアソカゼインの分解

実施例2で得た0.05mlの細胞抽出液を0.15mlの酵素反応液 (終濃度5mg/ml アソカゼイン {シグマ社製}、100mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA、2mM DTT、pH5.5) に混合し、37℃、1時間反応させた。0.2mlの10% トリクロロ酢酸溶液を加え、4℃で5分静置後、遠心し (1,000rpm, 10分)、得られた上清の366nmの吸光度を測定した。コントロールのmockの細胞抽出液にくらべ、新規システインプロテアーゼを含む細胞抽出液を用いた場合、吸光度が0.1上昇した。このことから、実施例2で得た細胞抽出液に含まれるヒト脾臓由来システインプロテアーゼが、アソカゼインを分解することが分かった。

【0071】

【実施例4】阻害剤探索系の設定

96穴プレート (フルオロBプレート、大日本製薬製) に実施例2で得られた細胞破砕液10μLと0.1% Brij 35 (シグマ社) 15μLおよび50μLの緩衝液 (0.2M 酢酸ナトリウム (pH5.5)、4mM 1,

4-ジチオスレイトール、2.5mM エチレンジアミンテトラ酢酸、0.05% トリトンX-100) を加え、37℃にて5分間プレインキュベーションした後、20μMの基質 [Z-Leu-Arg-MCA] を25μL添加することによって酵素反応を開始した。37℃にて10分反応後、マイクロプレートリーダー (MTP-32, CORONA ELECTRONIC製) を用いて、励起波長365nm、吸収波長460nmで反応液中の蛍光強度を測定した。細胞破砕液無添加の場合の蛍光強度 (86) に対し、細胞破砕液を添加した場合は、1520の蛍光強度を示した。この反応にシステインプロテアーゼ阻害剤であるE-64 (ペプチド研究所) を各種濃度添加することによりプロテアーゼ活性が阻害され、E-64は約25nMでこの酵素反応を50%阻害した。このことから、本アッセイ系を用いて、システインプロテアーゼ阻害剤の探索が可能であることを確認した。

【0072】

【実施例5】抗システインプロテアーゼポリクローナル抗体の取得

実施例1でpTB1920を得た際に同時に得られたシステインプロテアーゼ遺伝子の82番目のグアニンから以降を含むプラスミドを制限酵素SalI, NotIで切断し、その挿入部分を同様に処理したpGEX4T-3 (ファルマシア) にライゲーションした。このライゲーション液を用いて大腸菌JM109 (宝酒造 (株)) を形質転換し、大腸菌 (*Escherichia coli*) JM109/pGEX4T-3/Cysを得た。次に、この大腸菌を用いて、本発明の組換え型ヒト脾臓由来システインプロテアーゼを取得した。大腸菌での発現・精製は、Bulk and RediPack GST Purification Modules (ファルマシア) 添付のプロトコールに準じて行なった。その結果、目的のグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質は、1Lの大腸菌培養液から1.8mg取得できた。得られた組換え型ヒト脾臓由来システインプロテアーゼ (200μg) を完全フロイントアジュバントに懸濁し、日本白色ウサギに初回免疫を行なった。以後、2週間毎4回、400μgの組換え型ヒト脾臓由来システインプロテアーゼを不完全フロイントアジュバントに懸濁後免疫した。最終免疫の1週後に全採血することにより、約50mlの血清が取得できた。抗体価の測定は以下に行なった。組換え型ヒト脾臓由来システインプロテアーゼを0.5μg/ウェルとなるように固定化した後、BSAでブロッキングした96穴プレートに、希釈したウサギ血清を添加し、室温で2時間静置した。0.1% Tween-20を含むPBSで洗浄後、抗ウサギIgG-パーオキシダーゼ (Capel製) を加え2時間静置した。洗浄後、o-フェニレンジアミンと過酸化水素を含むクエン酸-リン酸緩衝液を加え、20分間発色させた。反応を1M硫酸で停止させた後、プレートリーダーを用いて492nmの発色を測定した。その結

果、非免疫ウサギの約1万倍の抗体価を示す抗血清が得られた。

【0073】

【発明の効果】本発明のタンパク質等またはDNAは、例えば、糖尿病性腎症、子球体腎炎などの腎疾患、肝繊維症などの肝疾患、肺繊維症、椎間板ヘルニア、脊髄すべり症、坐骨神経痛、大理石病などの種々の疾病の治療・予防剤として使用することができる。また、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等のプロテアーゼ活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用試薬として有用である。さらに、本発明の

配列

Met	Val	Cys	Arg	Leu	Pro	Val	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Phe
1				5						10				15	
Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Gly	Arg	His	Val	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Cys
			20					25						30	
Gly	Pro	Val	Asp	Thr	Lys	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ala
			35					40						45	
Phe	Thr	Gln	Gly	Ser	Ala	Met	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Asn	His	Pro
			50				55						60		
Asp	Asn	Arg	Asn	Glu	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu
65					70					75					80
Asp	Pro	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Pro	Val	Lys	Met	Ala	Ser	Ile	Phe	Lys
				85					90					95	
Asn	Phe	Val	Ile	Thr	Tyr	Asn	Arg	Thr	Tyr	Glu	Ser	Lys	Glu	Glu	Ala
			100					105						110	
Arg	Trp	Arg	Leu	Ser	Val	Phe	Val	Asn	Asn	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Lys
			115					120						125	
Ile	Gln	Ala	Leu	Asp	Arg	Gly	Thr	Ala	Gln	Tyr	Gly	Val	Thr	Lys	Phe
			130					135						140	
Ser	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Phe	Arg	Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Leu
145					150					155					160
Leu	Arg	Lys	Glu	Pro	Gly	Asn	Lys	Met	Lys	Gln	Ala	Lys	Ser	Val	Gly
				165					170						175
Asp	Leu	Ala	Pro	Pro	Glu	Trp	Asp	Trp	Arg	Ser	Lys	Gly	Ala	Val	Thr
				180				185						190	
Lys	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	Met	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Val
				195				200						205	
Thr	Gly	Asn	Val	Glu	Gly	Gln	Trp	Phe	Leu	Asn	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu
				210				215						220	
Ser	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Lys	Met	Asp	Lys	Ala
225					230					235					240
Cys	Met	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Asn	Leu
				245					250					255	
Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Gln	Gly	His	Met	Gln
				260				265						270	
Ser	Cys	Asn	Phe	Ser	Ala	Glu	Lys	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Asn	Asp	Ser
				275				280						285	
Val	Glu	Leu	Ser	Gln	Asn	Glu	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Lys
				290				295						300	

タンパク質等に対する抗体は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量などに使用することができる。

【0074】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：392

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク

41

42

Arg Gly Pro Ile Ser Val Ala Ile Asn Ala Phe Gly Met Gln Phe Tyr
 305 310 315 320
 Arg His Gly Ile Ser Arg Pro Leu Arg Pro Leu Cys Ser Pro Trp Leu
 325 330 335
 Ile Asp His Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Asn Arg Ser Asp Val
 340 345 350
 Pro Phe Trp Ala Ile Lys Asn Ser Trp Gly Thr Asp Trp Gly Glu Lys
 355 360 365
 Gly Tyr Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys Gly Val Asn Thr
 370 375 380
 Met Ala Ser Ser Ala Val Val Asp
 385 390

【0075】

【配列番号：2】

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Pro Pro Glu Trp Asp Trp Arg Ser Lys Gly Ala Val Thr Lys Val
 1 5 10 15
 Lys Asp Gln Gly Met Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Thr Gly
 20 25 30
 Asn Val Glu Gly Gln Trp Phe Leu Asn Gln Gly Thr Leu Leu Ser Leu
 35 40 45
 Ser Glu Gln Glu Leu Leu Asp Cys Asp Lys Met Asp Lys Ala Cys Met
 50 55 60
 Gly Gly Leu Pro Ser Asn Ala Tyr Ser Ala Ile Lys Asn Leu Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Glu Thr Glu Asp Asp Tyr Ser Tyr Gln Gly His Met Gln Ser Cys
 85 90 95
 Asn Phe Ser Ala Glu Lys Ala Lys Val Tyr Ile Asn Asp Ser Val Glu
 100 105 110
 Leu Ser Gln Asn Glu Gln Lys Leu Ala Ala Trp Leu Ala Lys Arg Gly
 115 120 125
 Pro Ile Ser Val Ala Ile Asn Ala Phe Gly Met Gln Phe Tyr Arg His
 130 135 140
 Gly Ile Ser Arg Pro Leu Arg Pro Leu Cys Ser Pro Trp Leu Ile Asp
 145 150 155 160
 His Ala Val Leu Leu Val Gly Tyr Gly Asn Arg Ser Asp Val Pro Phe
 165 170 175
 Trp Ala Ile Lys Asn Ser Trp Gly Thr Asp Trp Gly Glu Lys Gly Tyr
 180 185 190
 Tyr Tyr Leu His Arg Gly Ser Gly Ala Cys Gly Val Asn Thr Met Ala
 195 200 205
 Ser Ser Ala Val Val Asp
 210

【0076】

【配列番号：3】

配列の長さ：1176

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATGGTGTGCC GGCTCCCCGT GTCCAAGAAA ACCCTGCTCT GCAGCTTCCA AGTCCTGGAT

60

43

44

GAGCTCGGAA GACACGTGCT GCTGCGGAAG GACTGTGGCC CAGTGGACAC CAAGGTTCCA 120
 GGTGCTGGGG AGCCCAAGTC AGCCTTCACT CAGGGCTCAG CCATGATTTC TTCTCTGTCC 180
 CAAAACCATC CAGACAACAG AAACGAGACT TTCAGCTCAG TCATTTCCCT GTTGAATGAG 240
 GATCCCCTGT CCCAGGACTT GCCTGTGAAG ATGGCTTCAA TCTTCAAGAA CTTTGTTCATT 300
 ACCTATAACC GGACATATGA GTCAAAGGAA GAAGCCCGGT GGCCTCTGTC CGTCTTTGTC 360
 AATAACATGG TGGAGCACA GAAGATCCAG GCCCTGGACC GTGGCACAGC TCAGTATGGA 420
 GTCACCAAGT TCAGTGATCT CACAGAGGAG GAGTTCCGCA CTATCTACCT GAATACTCTC 480
 CTGAGGAAAG AGCCTGGCAA CAAGATGAAG CAAGCCAAAGT CTGTGGGTGA CCTCGCCCA 540
 CCTGAATGGG ACTGGAGGAG TAAGGGGGCT GTCACAAAAG TCAAAGACCA GGGCATGTGT 600
 GGCTCCTGCT GGGCCTTCTC AGTCACAGGC AATGTGGAGG GCCAGTGGTT TCTCAACCAG 660
 GGGACCCTGC TCTCCCTCTC TGAACAGGAG CTCTTGGACT GTGACAAGAT GGACAAGGCC 720
 TGCATGGGCG GCTTGGCCCTC CAATGCCTAC TCGGCCATAA AGAATTTGGG AGGCTGGAG 780
 ACAGAGGATG ACTACAGCTA CCAGGGTCAC ATGCAGTCCT GCAACTTCTC AGCAGAGAAG 840
 GCCAAGGTCT ACATCAATGA CTCCTGGAG CTGAGCCAGA ACGAGCAGAA GCTGGCAGCC 900
 TGGCTGGCCA AGAGAGGCC AATCTCCGTG GCCATCAATG CCITTGGCAT GCAGTTTAC 960
 CGCCACGGGA TCTCCCGCCC TCTCCGGCCC CTCTGCAGCC CTTGGCTCAT TGACCATGCG 1020
 GTGTTGCTTG TGGGCTACGG CAACCGCTCT GACGTTCCCT TTTGGGCCAT CAAGAACAGC 1080
 TGGGGCACTG ACTGGGGTGA GAAGGGTTAC TACTACTTGC ATCGTGGGTC CGGGCCCTGT 1140
 GCGGTGAACA CCATGGCCAG CTCGGCGGTG GTGGAC 1176

【0077】

【配列番号：4】

配列の長さ：642

配列の型：核酸

20 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GCCCCACCTG AATGGGACTG GAGGAGTAAG GGG
 GCTGTCA CAAAAGTCAA AGACCAGGGC 60
 ATGTGTGGCT CCTGCTGGGC CTTCTCAGTC ACA
 GGCAATG TGGAGGGCCA GTGGTTTCTC 120
 AACCAGGGGA CCCTGCTCTC CCTCTCTGAA CAG
 GAGCTCT TGGACTGTGA CAAGATGGAC 180
 AAGGCCTGCA TGGGCGGCTT GCCCTCCAAT GCC
 TACTCGG CCATAAAGAA TTTGGGAGGG 240
 CTGGAGACAG AGGATGACTA CAGCTACCAG GGT
 CACATGC AGTCCTGCAA CTTCTCAGCA 300
 GAGAAGGCCA AGGTCTACAT CAATGACTCC GTG
 GAGCTGA GCCAGAACGA GCAGAAGCTG 360
 GCAGCCTGGC TGGCCAAGAG AGGCCCAATC TCC
 GTGGCCA TCAATGCCTT TGGCATGCAG 420
 TTTTACCGCC ACGGGATCTC CCGCCCTCTC CGG
 CCCCTCT GCAGCCCTTG GCTCATTGAC 480
 CATGCGGTGT TGCTTGTGGG CTACGGCAAC CGC
 TCTGACG TTCCCTTTTG GGCCATCAAG 540
 AACAGCTGGG GCACTGACTG GGGTGAGAAG GGT
 TACTACT ACTTGCATCG TGGGTCCGGG 600
 GCCTGTGGCG TGAACACCAT GGCCAGCTCG GCG
 GTGGTGG AC 642

【0078】

【配列番号：5】

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

50 配列

GGACCGTGGC ACAGCTCAGT ATG

23

【0079】

【配列番号：6】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTGTTGCCAG GCTCTTTTCT CAGG 24

【0080】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼ（プロ領域+成熟体）のアミノ酸配列を示す。

【図2】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼの活性部位（成熟体）のアミノ酸配列を示す。

【図3】本発明のヒト脾臓由来システインプロテアーゼをコードするDNAを含むDNAの塩基配列を示す。

【図1】

Met	Val	Cys	Arg	Leu	Pro	Val	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Phe	Gln	Val	Leu	Asp	20
Glu	Leu	Gly	Arg	His	Val	Leu	Leu	Arg	Lys	Asp	Cys	Gly	Pro	Val	Asp	Thr	Lys	Val	Pro	40
Gly	Ala	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Ala	Phe	Thr	Gln	Gly	Ser	Ala	Met	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	60
Gln	Asn	His	Pro	Asp	Asn	Arg	Asn	Glu	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	80
Asp	Pro	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Pro	Val	Lys	Met	Ala	Ser	Ile	Phe	Lys	Asn	Phe	Val	Ile	100
Thr	Tyr	Asn	Arg	Thr	Tyr	Glu	Ser	Lys	Glu	Glu	Ala	Arg	Trp	Arg	Leu	Ser	Val	Phe	Val	120
Asn	Asn	Met	Val	Arg	Ala	Gln	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Asp	Arg	Gly	Thr	Ala	Gln	Tyr	Gly	140
Val	Thr	Lys	Phe	Ser	Asp	Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Phe	Arg	Thr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Thr	Leu	160
Leu	Arg	Lys	Glu	Pro	Gly	Asn	Lys	Met	Lys	Gln	Ala	Lys	Ser	Val	Gly	Asp	Leu	Ala	Pro	180
Pro	Glu	Trp	Asp	Trp	Arg	Ser	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Lys	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	Met	Cys	200
Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Val	Thr	Gly	Asn	Val	Glu	Gly	Gln	Trp	Phe	Leu	Asn	Gln	220
Gly	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Lys	Met	Asp	Lys	Ala	240
Cys	Met	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Asn	Leu	Gly	Gly	Leu	Glu	260
Thr	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Gln	Gly	His	Met	Gln	Ser	Cys	Asn	Phe	Ser	Ala	Glu	Lys	280
Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Asn	Asp	Ser	Val	Glu	Leu	Ser	Gln	Asn	Glu	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	300
Trp	Leu	Ala	Lys	Arg	Gly	Pro	Ile	Ser	Val	Ala	Ile	Asn	Ala	Phe	Gly	Met	Gln	Phe	Tyr	320
Arg	His	Gly	Ile	Ser	Arg	Pro	Leu	Arg	Pro	Leu	Cys	Ser	Pro	Trp	Leu	Ile	Asp	His	Ala	340
Val	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Val	Pro	Phe	Trp	Ala	Ile	Lys	Asn	Ser	360
Trp	Gly	Thr	Asp	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	His	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Cys	380
Gly	Val	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Val	Asp									392

【図2】

Ala	Pro	Pro	Glu	Trp	Asp	Trp	Arg	Ser	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Lys	Val	Lys	Asp	Gln	Gly	20
Met	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Val	Thr	Gly	Asn	Val	Glu	Gly	Gln	Trp	Phe	Leu	40
Asn	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Asp	Cys	Asp	Lys	Met	Asp	60
Lys	Ala	Cys	Met	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Asn	Ala	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Asn	Leu	Gly	Gly	80
Leu	Glu	Thr	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Gln	Gly	His	Met	Gln	Ser	Cys	Asn	Phe	Ser	Ala	100
Glu	Lys	Ala	Lys	Val	Tyr	Ile	Asn	Asp	Ser	Val	Glu	Leu	Ser	Gln	Asn	Glu	Gln	Lys	Leu	120
Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Lys	Arg	Gly	Pro	Ile	Ser	Val	Ala	Ile	Asn	Ala	Phe	Gly	Met	Gln	140
Phe	Tyr	Arg	His	Gly	Ile	Ser	Arg	Pro	Leu	Arg	Pro	Leu	Cys	Ser	Pro	Trp	Leu	Ile	Asp	160
His	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Tyr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Val	Pro	Phe	Trp	Ala	Ile	Lys	180
Asn	Ser	Trp	Gly	Thr	Asp	Trp	Gly	Glu	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	His	Arg	Gly	Ser	Gly	200
Ala	Cys	Gly	Val	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Val	Asp							214

【図3】

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CGGACCGCTGGCGGCGACCGCTGGCGGCGACCGCTGGCGGCGACCGCATGGTGTGCGCGCTCCCGGTGTCCAAAGAAAACCTGCTCTCCAGC
M V C R L P V S K K T L L C S

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTCCAAGTCTGGATGAGCTCGCAAGACACGCTGCTGCTGCGGAAGGACTGTGCGCCAGTGGACACCAAGCTTCCAGGTGCTGGGAGGCCAAGTCAGCCT
F Q V L D E L G R H V L L R K D C G P V D T K V P G A G E P K S A F

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TCACTCAGGGCTCAGCCATGATTCTTCTGCTGCCAAAACATCCAGACAACAGAAACGAGACTTTCAGCTCAGTCATTTCCTGTTGAATGAGGATCC
T Q O S A M I S S L S Q N H P D N R N E T F S S V I S L L N E D P

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CCTGTCGCCAGGACTTGCCTGTGAAGATGGCTTCAATCTTCAAGAACTTTGTCTATTACCTATAACCGGACATATGAGTCAAAGGAAGGCCCGGTGGCGC
L S Q D L P V K M A S I F K N F V I T Y H R T Y E S K E E A R W R

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CTGTCGGTCTTTGTCAATAACATGGTCCGAGCACAGAAATCCAGGCCCTGGACCGTGGCACAGCTCAGTATGAGTCAACAAAGTTCAGTGATCTCACAG
L S V F V N N M V R A Q K I Q A L D R G T A Q Y C V T K F S D L T E

510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
AGGAGGAGTTCGCGACTATCTACCTGAATACTCTCTGAGGAAAGACCTGGCAACAAGATGAAGCAAGCCAAGTCTGTGGTGGACCTCCGCCACCTGA
E E F R T I T L N T L L R K E P G N K M K Q A K S V G D L A P P E

610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
ATGGGACTGGAGGAGTAAAGGGGCTGTCAAAAAGTCAAAGACACAGGCGCATGTGTGGCTCTGCTGGGCTTCTCAGTCACAGGCAATGTGGAGGGCCAG
M D W R S K C A V T K V K D Q G M C G S C W A P S V T C N V E G O

710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
TGGTCTCTCAACAGGGGACCTGCTCTCCCTCTCTGAACAGGAGCTCTTGGACTGTGACAAGATGGACAAGGCTGCATGGGGCGCTTGGCCCTCAATG
W F L N Q G T L L S L S E Q E L L D C D K M D K A C M G G L P S N A

810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
CCTACTCGGCATAAAGAAATTTGGAGGGCTGGAGACAGAGGATGACTACAGCTACCAAGGTACATGACGTCTGCAACTTCTCAGCAGAGAAAGGCCAA
Y S A I K N L C G L E T E D D Y S Y O G H N Q S C N P S A E K A K

910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
GGTCTACATCAATGACTCCGTGGAGCTGAGCCAGAACGAGCAGAAGCTGGCAGCCTGGCTGGCCAGAGAGGGCCCAATCTCCGTGGCCATCAATGCCCTTT
V Y I N D S V E L S Q N E Q K L A A W L A K R G P I S V A I N A F

1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
GGCATGCAGTTTACCGCCACGGGATCTCCCGCCCTCTCCGGCCCTCTGCAAGCCCTTGGCTCATTGACCATGCGGTGTTGCTTGTGGCTACGGCAACC
G M O F Y R H G I S R P L R P L C S P W L I D H A V L L V G C Y G N R

1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GCTCTGAGCTTCCCTTTTGGGCCATCAAGAACAGCTGGGGCCTGACTGGGGTGAGAAAGGTTACTACTTGCATCTGTGGGTCCGGGCTGTGGCGT
S D V P F W A I K N S W G T D W G B K G Y Y Y L H R G S C A C G V

1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
GAACACCATGGCCAGCTCGCGGTGGTGGACTGAAGAGGGGCCCCCAOCTCGGACCTGGTGCTGATCAGAGTGGCTGCTGCCCGAGCCTGACATGTGTC
N T H A S S A V V D

1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
CAGGCCCTCCCGGGAGGTACAGCTGGCAGAGGGAAGGCACTGGGTACCTCAGGGTGAGCAGAGGGCACTGGCTGGGGCACAGCCCTGCTTCCCTG
CAGCCCATCCCACTCAAGTCTGCACCTGCACCTTTGTGAATTTGGTAGCTTAGGAAGATGTCCGGGTGAAGGTTGGTATCTTGGCAGTTGAAGC

1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580    1590    1600
TGGGGCAAGAACTCTGGGCTTGGGTAAATGAGCAGGAAGAAAATTTCTGATCTTAAGCCCAAGCTCTGTCTGCCCCCTTCTCTGTTGATACTATA

1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690    1700
AATTTCTGGTTCCCTTGGATTAGGATAGTGTCTCTCCATGTCCAGGAACCTTGTAAACCACCTTTTCTAACAGCAATAAAGAGGCTGCTCTGCTC
CCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 48/00

識別記号

A B J

A B L

A C D

A C K

A C S

F I

A 61 K 48/00

A B L

A C D

A C K

A C S

A C V

ACV
ADA
ADP
ADT
ADU
AED

ADA
ADP
ADT
ADU
AED

B

C 0 7 H 21/04
C 1 2 N 1/21
5/10
9/50
C 1 2 P 21/08
G 0 1 N 33/53
33/577

C 0 7 H 21/04
C 1 2 N 1/21
9/50
C 1 2 P 21/08
G 0 1 N 33/53
33/577
A 6 1 K 37/54
C 1 2 N 5/00

D

B

B

/(C 1 2 N 15/09 ZNA
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 9/50
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 9/50
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)